

Mise en évidence de nouveaux virus à ARN chez *Pteroteinion laufella* Hewitson (Lepidoptera Hesperidae), défoliateur du palmier à huile en Côte-d'Ivoire

Discovery of new RNA viruses in *Pteroteinion* *laufella* Hewitson (Lepidoptera Hesperidae), an oil palm leaf eater in the Ivory Coast

S. HERDER⁽¹⁾, G. FEDIÈRE⁽¹⁾, K.N. KOUASSI⁽¹⁾, X. LERY⁽¹⁾, R. KOUÉVIDJIN⁽¹⁾, R. PHILIPPE⁽²⁾, D. MARIAU⁽²⁾

Résumé — Parmi les principaux défoliateurs du palmier à huile en Côte-d'Ivoire, une espèce, *Pteroteinion laufella* pullule fréquemment et il est alors nécessaire d'intervenir à l'aide d'insecticides chimiques. Pendant les pullulations de cette espèce, des cas de mortalité naturelle dus à des microorganismes, notamment des virus, se manifestent dans les populations à forte densité. Deux nouveaux virus icosahédriques et non enveloppés à ARN, l'un de 40 nm de diamètre et l'autre de 30 nm de diamètre, ont été isolés. La capsid du virus de 40 nm est constituée de 3 types de protéines, dont une majeure d'un poids moléculaire de 53.000 daltons et de 2 mineures d'un poids moléculaire de 65.000 et 34.000 daltons. Leurs propriétés biophysiques, biochimiques et immunologiques ne permettent pas actuellement de les rapprocher véritablement d'une autre famille de virus à ARN.

Mots clés. — *Pteroteinion laufella*, Lepidoptera, entomopathogène, virus à ARN, palmier à huile, Côte-d'Ivoire.

Abstract. — Among the main oil palm leaf eaters in the Ivory Coast, there are frequent outbreaks of one species, *Pteroteinion laufella*, against which chemical insecticides have to be used. During outbreaks of this species, cases of natural death due to microorganisms, particularly viruses, occur in high density populations. Two new RNA icosahedral viruses without an envelope have been isolated, one 40 nm in diameter and the other 30 nm in diameter. The capsid of the 40 nm virus is composed of three types of proteins, one major with a molecular weight of 53,000 daltons and two minor with a molecular weight of 65,000 and 34,000 daltons respectively. Given their biophysical, biochemical and immunological properties, it is currently impossible to really liken them to another RNA virus family.

Key words. — *Pteroteinion laufella*, Lepidoptera, entomopathogen, RNA virus, oil palm, Ivory Coast.

INTRODUCTION

La culture industrielle des palmacées, en particulier celle du palmier à huile et du cocotier revêt une importance économique croissante dans les zones intertropicales du globe. Le développement de la culture de ces oléagineux (environ 15 millions d'hectares) s'est accompagné de la colonisation de ces nouvelles niches écologiques par un grand nombre d'insectes ravageurs.

Tous les organes de la plante peuvent être attaqués, mais la plupart des espèces vivent cependant aux dépens des feuilles juvéniles ou déployées.

La lutte biologique, à partir de microorganismes et en particulier à l'aide de virus, est une alternative à la lutte chimique presque exclusivement employée jusqu'à présent.

Sur le palmier à huile, en Côte-d'Ivoire, d'autres virus entomopathogènes ont déjà été décrits : un Densovirus chez *Casphalia extranea* (Fédière, 1983, 1991), un Picornavirus (Fédière, 1983, 1990) et un Baculovirus (Kouassi et al., 1991) chez *Latoia viridissima*, enfin un Picornavirus chez *Turnaca rufisquamata* (Fédière et al., 1992).

INTRODUCTION

The commercial cultivation of palms, particularly oil palm and coconut, is taking on increasing economic importance in the intertropical zones of the world. Development of the cultivation of these oil crops (around 15 million hectares) went hand in hand with the colonization of these new ecological niches by a large number of insect pests.

All the organs of a plant can be attacked, but most species live off juvenile or fully opened leaves.

Biological control, using microorganisms and particularly viruses, is an alternative to chemical control, which has been used almost exclusively until now.

On oil palm in the Ivory Coast, other entomopathogenic viruses have already been described: a Densovirus in *Casphalia extranea* (Fédière, 1983, 1991), a Picornavirus (Fédière, 1983, 1990) and a Baculovirus (Kouassi et al., 1991) in *Latoia viridissima*, and finally a Picornavirus in *Turnaca rufisquamata* (Fédière et al., 1992).

(1) Laboratoire d'Entomovirologie ORSTOM BP V 51 Abidjan (Côte-d'Ivoire)

(2) CIRAD-CP - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France)

(1) Entomovirology Laboratory, ORSTOM, BP V 51 Abidjan (Ivory Coast)

(2) CIRAD-CP - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France)

C'est dans le cadre de ce programme d'identification de nouveaux virus entomopathogènes que se situe notre étude de viroses chez le Lépidoptère Hesperidae *Pteroteinion lauffella* Hewitson. Ces viroses engendrent des mortalités naturelles lors de pullulations de ces insectes en plantations.

MATERIEL ET METHODES

Le matériel vivant

Les larves du Lépidoptère Hesperidae *Pteroteinion lauffella* (P.L.) apparaissent régulièrement en pullulation dans les palmeraies industrielles du sud de la Côte-d'Ivoire (Fig. 1). L'adulte est un papillon diurne au corps robuste, de taille moyenne (5 à 6 cm), aux ailes relativement petites, de coloration souvent rouge-orangée maculée de sombre ou noires maculées de blanc (Mariau *et al.*, 1981) (Fig. 2).

Les chenilles ont été récoltées sur la plantation de palmier à huile de La Mé puis disposées dans des boîtes aérées et transportées jusqu'au laboratoire.

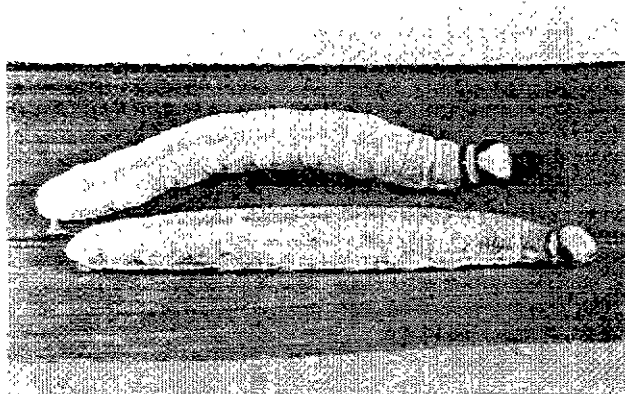


FIG. 1. — Larves de *Pteroteinion lauffella* en fin de développement. — (Final-instar *Pteroteinion lauffella* larvae)

Techniques de pathologie expérimentale

La recherche et l'isolement du virus se sont faits en plusieurs étapes. Après observation des anomalies de comportement et des mortalités des larves, des contrôles en microscopie à contraste de phase de frottis d'hémolymphe, de tissu adipeux, d'hypoderme et d'intestin moyen ont été effectués. Les broyats de larves malades ont été observés en microscopie électronique.

Les chenilles présumées saines sont regroupées par 25 dans des cages en tulle, et infectées *per os* par badigeonnage des folioles de palmiers à l'aide de broyats de larves malades.

Techniques de purification des virus

Les larves infectées sont broyées dans du tampon phosphate 0,5 M contenant 0,08% de désoxycholate de sodium, pH 7,4. Le broyat est filtré sur mousseline, clarifié (5.000 g) puis mis au culot par ultracentrifugation à 145.000 g pendant 2 heures. Le culot est repris dans du tampon et dispersé par ultrasonication. Après une nouvelle clarification le surnageant est déposé sur un gradient de densité de saccharose 15 - 45 % (en poids) et centrifugé à 100.000 g pendant 2 heures. Le tracé absorptiométrique du gradient est obtenu à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La suspension virale purifiée est conservée en tampon phosphate.

*Our study of virus diseases in *Pteroteinion lauffella* Hewitson *Lepidoptera Hesperidae* fits into this programme to identify new entomopathogenic viruses. These virus diseases cause natural death during outbreaks of these insects in plantations.*

MATERIAL AND METHODS

Living material

The larvae of *Pteroteinion lauffella* *Lepidoptera Hesperidae* (P.L.) regularly appear in outbreaks in the commercial oil plantations in the southern Ivory Coast (Fig. 1). The adult is a diurnal moth with an average sized, thick body (5 to 6 cm), with relatively small wings, often orangey-red with dark spots, or black with white spots (Mariau *et al.*, 1981) (Fig. 2).

The caterpillars were collected in the La Mé oil palm plantation then placed in aerated boxes and transported to the laboratory.

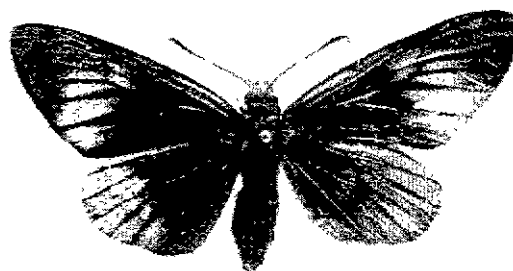


FIG. 2. — Papillon adulte — (Adult moth)

Experimental pathology techniques

Finding and isolating viruses is carried out in several stages. After observing abnormal behaviour and mortality in the larvae, smears of haemolymph, adipose tissue, hypodermis and middle intestine are examined under a phase-contrast microscope. Liquidized diseased larvae were then observed under an electron microscope.

Caterpillars assumed to be healthy were placed in groups of 25 in net cages and infected *perorally*, by daubing oil palm leaflets with the liquidized diseased larvae.

Virus purification techniques

The infected larvae were liquidized in a 0.5 M phosphate buffer containing 0.08% of sodium desoxycholate, pH 7.4. The resulting fluid was then filtered through muslin, clarified (5,000 g) and ultracentrifuged at 145,000 g for 2 hours to leave a residue. The residue was returned to the buffer and dispersed by ultrasound. After further clarification, the supernatant was placed on a 15-45% (in weight) sucrose density gradient and centrifuged at 100,000 g for 2 hours. The absorptiometric graph of the gradient was obtained at 260 nm using a spectrophotometer. The purified viral suspension was preserved in phosphate buffer.

Techniques de caractérisation des virus

La structure et la taille des particules virales sont déterminées en microscopie électronique après contraste négatif à l'acétate d'uranyle à 2%.

Le spectre d'absorption photométrique dans le proche UV (220 à 320 nm) permet de contrôler la pureté des suspensions virales ainsi que sa concentration.

La nature de l'acide nucléique du virus a été mise en évidence par dosage colorimétrique. L'ADN est dosé par la réaction à la diphenylamine (Giles et Myers, 1965) et l'ARN par la réaction à l'orcinol (Mejbaum, 1939).

Le nombre et le poids moléculaire des protéines virales ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (8%) selon la méthode de Weber et Osborn (1969). Six protéines de référence ont été utilisées : la phosphorylase b (PM = 94.000), la sérualbumine bovine (PM = 67.000), l'ovalbumine (PM = 43.000), l'anhydrase carbonique (PM = 30.000), l'inhibiteur de la trypsine (PM = 20.100) et la lactalbumine (PM = 14.400).

La caractérisation immunologique des virus s'est faite par la technique d'immunodiffusion en gel d'agarose (Ouchterlony, 1948).

Virus characterization techniques

The structure and size of the viral particles were determined under an electron microscope following negative contrasting with 2% uranyl acetate.

The photometric absorption spectrum in the near UV range (220 to 320 nm) was used to check the purity and concentration of the viral suspensions.

The nature of the nucleic acid in the virus was determined by colorimetric quantification. DNA was quantified by reaction with diphenylamine (Giles and Myers, 1965) and RNA by reaction with orcinol (Mejbaum, 1939).

The number and molecular weight of the viral proteins were determined by electrophoresis in polyacrylamide-SDS gel (8%) using the Weber and Osborn method (1969). Six reference proteins were used: phosphorylase b (MW = 94,000), bovine serum albumin (MW = 67,000), ovalbumin (MW = 43,000), carbonic anhydrase (MW = 30,000), trypsin inhibitor (MW = 20,100) and lactalbumin (MW = 14,400).

Immunological characterization was carried out using the agar gel immunodiffusion technique (Ouchterlony, 1948).

RESULTATS

Symptômes et déroulement de la maladie

Les symptômes de la maladie ont été décrits sur des larves naturellement contaminées prélevées en plantation ainsi que sur des larves infectées *per os* au laboratoire.

Les premiers symptômes consistent en une diminution d'activité et d'appétit des larves atteintes. La prise de nourriture s'arrête complètement entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour de contamination. Le tégument des larves initialement vert pâle devient jaune puis marron, le corps devient alors très flasque. Avant la mort, des sécrétions anales et buccales s'écoulent, marquant des altérations notables du tube digestif.

Les mortalités ont été comparées chez les larves des deux types précédemment décrits (Tabl. I). Après une semaine d'observation, la mortalité atteint 82 % chez les premières et 95 % chez les larves infectées expérimentalement, la maladie se propageant rapidement dans les cages.

RESULTS

Disease symptoms and development

The disease symptoms were described on naturally contaminated larvae taken from the plantation, and on larvae infected *perorally* in the laboratory.

The first symptoms were a reduction in the activity and appetite of infected larvae, which stopped feeding completely between the 1st and 3rd day after contamination. The integument of the larvae, which was initially pale green, turned yellow, then brown and the body became very flaccid. Before death there were secretions from the anus and mouth, indicating notable alterations in the digestive tube.

Death rates were compared for the two different types of larvae previously described (Table I). After a week's observations, the death rate reached 82% in the naturally infected larvae and 95% in the experimentally infected larvae, and the disease spread rapidly in the cages.

TABLEAU I — Mortalité cumulée chez des larves de *P. lauffella*. — (Cumulated mortality in *P. lauffella* larvae)

Nombre de jours après mise en observation (Number of days after observing)	250 larves infectées <i>per os</i> (250 <i>perorally</i> infected larvae)	250 larves récoltées en plantation (250 larvae collected from the plantation)
1	23 %	0 %
2	53 %	16 %
3	66 %	21 %
4	82 %	34 %
5	92 %	54 %
6	95 %	64 %
7	95 %	82 %
8	95 %	82 %

Caractérisation des virus

Les virus de *P. laufella* apparaissent au microscope électronique, sous forme de particules icosaédriques sans enveloppe, mesurant 30 et 40 nm de diamètre (Fig. 3).

Le rapport DO_{260}/DO_{280} de la suspension purifiée du virus de 40 nm est de 1,40.

L'acide nucléique constituant les génomes des deux virus s'avère être un ARN : réaction positive à l'orcinol et négative à la diphénylamine. De plus, un passage sur gel d'agarose du génome complet du virus de 40 nm confirme ce résultat.

L'analyse des protéines capsidaires du virus de 40 nm par électrophorèse fait apparaître trois protéines (PV1, PV2, PV3) dont une majeure (PV2 : PM = 53.000 daltons) et deux mineures (PV1 et PV3 : PM = 65.000 et 34.000 daltons).

Les parentés immunologiques pouvant exister entre les virus de *P. laufella* et quelques virus à ARN déjà caractérisés ont été recherchées : le Picornavirus de *Latoia viridissima* (Fédière, 1983), le virus de *Teinorhyncha umbra* (Fédière, 1985 a), le Picornavirus de *Teleogryllus oceanicus* (Crpv) et le virus de *Turnaca rufisquamata* (Fédière, 1992). Un anti-sérum de lapin a été préparé par injection d'une suspension contenant les deux virus de *P. laufella* (celui de 40 nm et celui de 30 nm non caractérisé). Ce sérum a réagi avec les deux antigènes homologues en donnant deux arcs de précipitation, alors qu'aucun arc n'a été observé entre cet anti-sérum et les autres virus testés (Fig. 4). Ce résultat suggère l'absence de parenté antigénique entre les virus de *P. laufella* et les virus déjà connus au laboratoire.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus conduit à considérer les virus de 30 et 40 nm de diamètre isolés chez *Pteroteinon laufella* comme des virus icosaédriques à ARN, qui, par leurs propriétés biophysiques, biochimiques et immunologiques ne permet pas de les rapprocher véritablement d'une autre famille de virus à ARN (Matthews, 1982).

Les tests de pathogénicité au laboratoire révèlent le caractère hautement pathogène de ces virus, capables de déclencher des mortalités en conditions naturelles. Ceci nous permet de fonder des espoirs pour son utilisation future en lutte biologique (Philippe, 1986).

Virus characterization

Under the electron microscope, *P. laufella* viruses appeared as icosahedral particles without envelopes, measuring 30 and 40 nm in diameter (Fig. 3).

The DO_{260}/DO_{280} ratio of the 40 nm purified virus suspension was 1.40.

The nucleic acid making up the genomes of the two viruses proved to be an RNA: positive reaction to orcinol and negative to diphenylamine. Moreover, switching the whole genome of the 40 nm virus to agar gel confirmed this result.

Electrophoretic analysis of the capsid proteins of the 40 nm virus revealed three proteins (PV1, PV2, PV3), one major (PV2: MW = 53,000 daltons) and two minor (PV1 and PV3: MW = 65,000 and 34,000 daltons respectively).

Any immunological relationships that might exist between the *P. laufella* viruses and a few already characterized RNA viruses were sought: the Picornavirus of *Latoia viridissima* (Fédière, 1983), the virus of *Teinorhyncha umbra* (Fédière, 1985a), the Picornavirus of *Teleogryllus oceanicus* (Crpv) and the virus of *Turnaca rufisquamata* (Fédière, 1992). A rabbit antiserum was prepared by injecting a suspension containing the two *P. laufella* viruses (the 40 nm one and the non-characterized 30 nm one). This antiserum reacted with the two homologous antigens, giving two precipitation arcs, whereas no arc was seen between this antiserum and the other viruses tested (Fig. 4). This result suggests that there is no antigenic relationship between the *P. laufella* viruses and viruses already known in the laboratory.

DISCUSSION AND CONCLUSION

All the above results lead to the 30 and 40 nm diameter viruses isolated from *Pteroteinon laufella* being considered as RNA icosahedral viruses, which, given their biophysical, biochemical and immunological properties, cannot really be likened to another RNA virus family (Matthews, 1982).

Pathogenicity tests in the laboratory revealed the highly pathogenic nature of these viruses, which are capable of triggering death under natural conditions. This provides hope for their future use in biological control (Philippe, 1986).

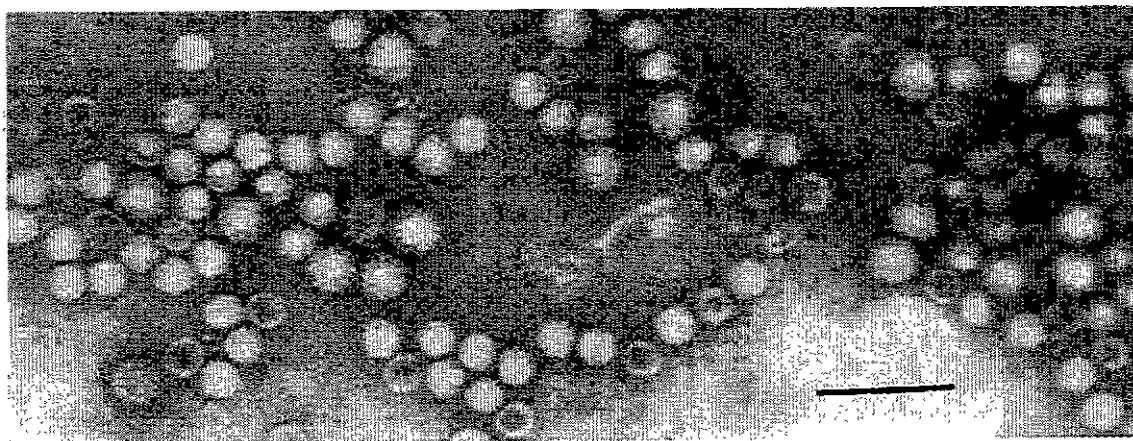


FIG.3. — Observation en microscopie électronique, après coloration négative, d'une suspension contenant les deux types de particules virales de 30 et 40 nm de diamètre de *Pteroteinon laufella* (la barre représente 100 nm) — (Observation under the electron microscope, after negative staining, of a suspension containing two types of *Pteroteinon laufella* viral particles 30 and 40 nm in diameter — scale bar represents 100 nm)

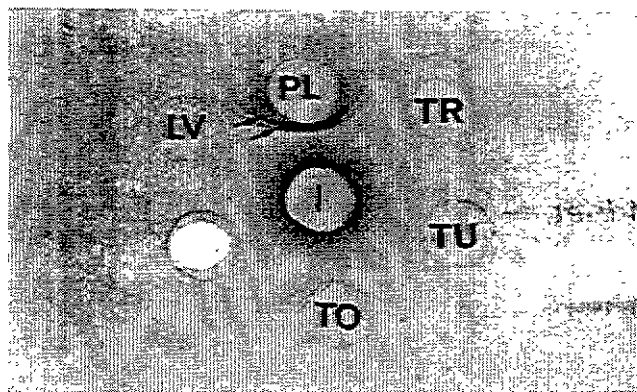


FIG. 4. — Caractérisation immunologique des virus de *P. lauffella* par immunodiffusion en gel d'agarose. — (Immunological characterization of the *P. lauffella* viruses by immunodiffusion in agar gel)

- PL : suspension contenant les 2 virus de *P. lauffella*
(suspension containing the 2 *P. lauffella* viruses)
LV : Picornavirus de *Latoia viridissima*
(Picornavirus of *Latoia viridissima*)
TO : Picornavirus de *Teleogryllus oceanicus*
(Picornavirus of *Teleogryllus oceanicus*)
TU : Virus de *Teinorhyncha umbra*
(Virus of *Teinorhyncha umbra*)
I : Antisérum de lapin anti-virus de *P. lauffella*
(*P. lauffella* anti-virus rabbit antiserum)
→ : Arc de précipitation
(Precipitation arc)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FEDIÈRE, G. (1983). — Recherche sur des viroses épizootiques de Lépidoptères Limacodidae ravageurs de Palmacées. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, U.S.T.L., Montpellier, 130 p., 28 pl.
- [2] FEDIÈRE, G., MONTSARRAT, P. (1985). — Mise en évidence d'un virus épizootique chez *Teinorhyncha umbra* (Lepidoptera Limacodidae) défoliateur du bananier en Côte-d'Ivoire. Communication à la 4ème conférence internationale sur l'impact des maladies à virus sur le développement des pays d'Afrique. Rabat, Maroc (14-19 avril 1985).
- [3] FEDIÈRE, G., PHILIPPE R., VEYRUNES J.C., MONTSARRAT P. (1990). — Biological control of oil palm pest *Latoia viridissima* Holland (Lepidoptera, Limacodidae) in Ivory Coast by a new Picornavirus. *Entomophaga*, 35, 347-354.
- [4] FEDIÈRE, G., HERDER S., KOUASSI K.N., LERY X., DAUTHUILLE D., BERGOIN M. (1991). — Restriction map of the *Casphalia extranea* densovirus genome. *Res. virol.* 142, 489-494.
- [5] FEDIÈRE, G., LERY, X., KOUASSI, K.N., HERDER, S., VEYRUNES, J.C., MARIAU, D. (1992). — Etude d'un nouveau virus à ARN chez *Turnaca rufisquamata* (Lepidoptera, Notodontidae) défoliateur du palmier à huile en Côte-d'Ivoire. *Oléagineux*, 47, 107-112.
- [6] GILES, K. W., MYERS, A. (1965). — An improved Diphenylamine method for the estimation of desoxyribonucleic acid. *Nature*. London, 206, 93.
- [7] KOUASSI N. K., FEDIÈRE, G., LERY, X., PHILIPPE, R., BERGOIN, M. (1991). — Mise en évidence d'un Baculovirus de polydroses nucléaire chez *Latoia viridissima* (Lépidoptère Limacodidae) ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte-d'Ivoire. *Oléagineux*, 46, 53-59.
- [8] KOUÉVIDJIN, K.R. (1986). — Recherches sur une virose de *Pteroteion lauffella*, Lépidoptère Hesperidae, défoliateur du palmier à huile en Côte-d'Ivoire. Mémoire de DEA, Université nationale de Côte-d'Ivoire, 35pp, 9 pl.
- [9] MARIAU, D., DESMIER DE CHENON, R., JULIA, J.F., PHILIPPE, R. (1981). Les ravageurs du palmier à huile et du cocotier en Afrique Occidentale. *Oléagineux*, 36, 192-193.
- [10] MATTHEWS, R.E.F. (1982). — Classification and nomenclature of viruses (Fourth report of the ICTV). *Intervirology*, 17, 1-199.
- [11] MEJBAUM, W. Z. (1939). Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in derivaten der adenylnsäure. *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117-120.
- [12] OUCHTERLONY, O. (1948). — Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Keni Miner. Geol. B*, 26, 16.
- [13] PHILIPPE, R. (1986). — Essais de lutte biologique contre les chenilles défoliatrices du palmier à huile et du cocotier. Rapport IRHO, 46pp.
- [14] WEBER, K., OSBORN, M. (1969). — The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.

RESUMEN

Puesta en evidencia de nuevos virus de ARN en *Pteroteion lauffella* Hewitson (Lepidoptera Hesperidae) defoliador de la palma aceitera en Costa de Marfil

S. HERDER, G. FEDIÈRE, K. N. KOUASSI, X. LERY, R. KOUÉVIDJIN, R. PHILIPPE, D. MARIAU, *Oléagineux*, 49, 1994, N°2, p. 43-47.

Entre los principales defoliadores de la palma aceitera en Costa de Marfil una especie, *Pteroteion lauffella* pulula frecuentemente y en tal caso resulta preciso intervenir mediante insecticidas químicos. Durante las pululaciones de esta especie, casos de mortandad natural causados por microorganismos, especialmente virus, se manifiestan en las poblaciones de fuerte densidad. Se aislaron dos nuevos virus icosaédricos de ARN desnudados, uno de 40 nm de diámetro y el otro de 30 nm de diámetro. La capsida del virus de 40 nm está constituida por 3 tipos de proteínas, de ellas una mayor de un peso molecular de 53.000 daltones y dos menores de un peso molecular de 65.000 y 34.000 daltones. No permiten sus propiedades biofísicas, bioquímicas e inmunológicas compararlas verdaderamente con otra familia de virus de ARN en la actualidad.

Palabras claves. — *Pteroteion lauffella*, Lépidoptera, entomopatógeno, virus de ARN, palma aceitera, Costa de Marfil